

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 21 日 (21.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/089412 A1(51) 国際特許分類⁷: A61K 45/00, 31/502, A61P 3/10, 3/04, 3/06, 9/00, 9/10, 9/04, 43/00 // C07D 403/04, 237/26

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005065

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 8 日 (08.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-103576 2003 年 4 月 8 日 (08.04.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町二丁目 6 番 9 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山本 登志弘 (YAMAMOTO, Toshihiro) [JP/JP]; 〒1038405 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP). 山田 久美 (YAMADA, Kumi) [JP/JP]; 〒1038405 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 高柳 昌生 (TAKAYANAGI, Masau); 〒1038405 東京都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号三菱ウェルファーマ株式会社 知的財産部 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SPECIFIC NAD(P)H OXIDASE INHIBITOR

(54) 発明の名称: 特異的 NAD(P)H オキシダーゼ抑制剤

(57) Abstract: An inhibitor for the hyperfunction of NAD(P)H oxidase containing a compound which substantially does not inhibit NADPH oxidase originating in leukocytes but inhibits NAD(P)H oxidase originating in tissues other than leukocytes, and a medicinal composition containing the same.

(57) 要約: 白血球の NADPH オキシダーゼ作用を実質的に抑制せず、かつ白血球以外の組織の NAD(P)H オキシダーゼ作用を阻害する化合物を含有する NAD(P)H オキシダーゼの過剰作用の抑制剤及びそれを含む医薬組成物。

明細書

特異的 N A D (P) H オキシダーゼ抑制剤

技術分野

5 本発明は、N A D (P) H オキシダーゼ (Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidase) の過剰発現又は活性化の抑制剤に関するものである。より詳細には、白血球の N A D P H オキシダーゼには作用せず、かつ白血球以外の組織において過剰発現又は活性化した N A D (P) H オキシ
10 ダーゼに対する抑制作用を示す化合物を有効成分とする N A D (P) H オキシダーゼの過剰作用の抑制剤に関するものである。

背景技術

15 高脂血症、高血圧、糖尿病、肥満、加齢、喫煙等のリスクファクターにより、虚血性心疾患（心筋梗塞又は狭心症等）、脳卒中（脑梗塞、脳出血又はくも膜下出血等）、動脈硬化や末梢循環障害（末梢動脈閉塞症等）等が発症したり、症状が増悪したりすることが知られており、これらの発症や症状増悪
20 に関して、近年、スーパーオキシドアニオン（ $\cdot O_2^-$ ）等の活性酸素により生ずる酸化ストレスの重要性がクローズアップされている。また、酸化ストレスが、ガン増殖（Gene. 2001, 269(1-2), 131）、アルツハイマー病の増悪（Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000, 273(1), 5）、抗ガン剤による副作用
25 （Toxicology. 1999 May 3; 134(1): 51-62）、さらに狭心症患者の硝酸製剤治療による薬剤耐性（J. Clinical Investigation, 1994, 187-194）に関与することも報告されている。

従来、スーパーオキシドアニオン等の活性酸素の産生源は、

白血球が主体であると考えられてきた。しかし、近年、血管細胞系や心筋細胞等の様々な細胞種においてもスーパーオキシドアニオンの産生が確認され、これらのスーパーオキシドアニオン産生酵素であるNAD(P)Hオキシダーゼが注目されている(Circ-Res.2000.86,494-501)。ところで、白血球に存在するNADPHオキシダーゼと血管細胞系や心筋細胞等の組織に存在するNAD(P)Hオキシダーゼとは、酵素活性や活性調節機構に差異があるため、それぞれのNAD(P)Hオキシダーゼは同一ではないと考えられている(Cardiovascular Research, 1998, 38, 256-262)。

NAD(P)Hオキシダーゼ活性を阻害する化合物として、これまでにDiphenyleneiodonium(以下「DPI」と記す。Biochem. Biophys. Res. Commun.1998, 253, 295 参照)、apocynin(国際公開第01/89517号パンフレット)、及びS17834(Arterioscler-Thromb-Vasc-Biol., 2001, 21:1577)等が報告されている。しかしながら、これらの化合物は白血球に存在するNADPHオキシダーゼのみならず、白血球以外の組織に存在するNAD(P)Hオキシダーゼにも作用するものであり、組織特異性を示さない。

白血球のNADPHオキシダーゼの遺伝的欠損症である慢性肉芽種症(Chronic granulomatous disease)の患者では、白血球のスーパーオキシドアニオン産生能が低下しており、免疫力の低下を起こすことが知られている(J.Leukoc.Biol.2001,69,191)。したがって、上述した非特異的NAD(P)Hオキシダーゼの阻害剤を医薬として用いる際には、免疫機能の低下等に基づく副作用が生じることがある。

発明の開示

本発明は、NAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用がリスク

3

ファクターである疾患を予防し、又は症状を軽減する医薬を提供することを課題とする。

本発明者らは鋭意研究した結果、白血球のNADPHオキシダーゼには抑制作用を示さず、白血球以外の組織のNAD(P)Hオキシダーゼに特異的に作用するNAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用の抑制剤により、上記課題を解決できることを見いだし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の要旨は、白血球のNADPHオキシダーゼ作用を実質的に抑制せず、かつ白血球以外の組織のNAD(P)Hオキシダーゼ作用を抑制する化合物を含有するNAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用の抑制剤、及びそれを有効成分とするNAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用に起因する疾病用の医薬組成物に存する。

図面の簡単な説明

第1図は、Achによる内皮依存性弛緩反応に対する化合物の効果を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書において、白血球以外の組織としては、例えば、血管細胞系、心臓、腎臓、網膜及びミクログリア等、並びに腫瘍細胞などが挙げられる。

血管細胞系としては、例えば、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞及び泡沫化マクロファージ等が挙げられる。

NAD(P)Hオキシダーゼは、NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) やNADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) を基質としてスーパーオキシドアニオンを産生する全ての酵素を意味する。

NAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用とは、NAD(P)Hオキシダーゼの過剰発現又は活性化に基づく作用を意味し、例えば、糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満、喫煙、心不全、心肥大、虚血性心疾患、血管再開通療法、臓器移植術の虚血再灌流、ガン、痴呆症、又は化学物質（例えば、抗ガン剤、硝酸製剤等）の摂取などのリスクファクターにより惹起される作用が挙げられる。

ここで、NAD(P)Hオキシダーゼの過剰発現とは、生体の恒常性（ホメオスタシス）にとって必要な量を超えた発現であり、同一起源の正常組織にとって必要な量を超えた発現を意味する。NAD(P)Hオキシダーゼの発現部位としては、例えば、血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア及び腫瘍細胞等の組織が挙げられるが、これらに限定されるものではない。すなわち、過剰発現したNAD(P)Hオキシダーゼの阻害作用とは、過剰発現しているNAD(P)Hオキシダーゼに対し、その酵素機能を発揮することができないようにする作用をいう。

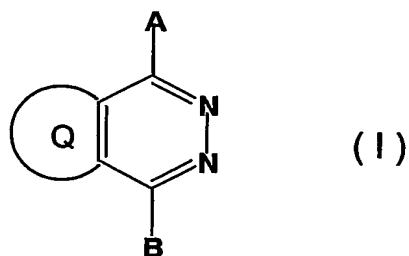
また、NAD(P)Hオキシダーゼの活性化とは、NAD(P)Hオキシダーゼを構成する各サブユニットのうち、 $p47^{phox}$ 、 $p40^{phox}$ 又は $p67^{phox}$ 等が細胞膜上にトランスロケーションされ、スーパーオキシドアニオン産生機能を発揮しうる状態にあるNAD(P)Hオキシダーゼを意味する。すなわち、活性化したNAD(P)Hオキシダーゼの抑制作用とは、酵素機能を発生し得る状態のNAD(P)Hオキシダーゼに対し、その酵素機能を抑制する作用を意味し、NAD(P)Hオキシダーゼを構成する各サブユニットのトランスロケーション又は／及び各構成サブユニット間の相互作用を抑制することをいう。

NAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用に起因する疾病とし

ては、例えば、虚血性心疾患、心不全、糖尿病性合併症、動脈硬化症、血管再開通療法後の再狭窄若しくは再閉塞、臓器移植後の障害、脳卒中、硝酸製剤耐性、抗ガン剤の副作用、痴呆症、又はガンの進展等が挙げられる。

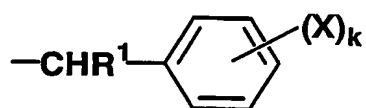
- 5 白血球のNADPHオキシダーゼ作用を実質的に抑制せず、かつ白血球以外の組織のNAD(P)Hオキシダーゼ作用を阻害する化合物としては、例えば、下記一般式(I)～(VIII)で表される二環式ピリダジン化合物が挙げられる。

一般式(I)

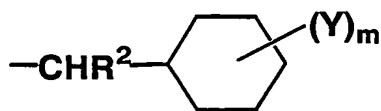


- 10 {式中、AはC₃～C₆アルキル、C₅～C₇シクロアルキル又はそれぞれがC₁～C₄アルキル、C₁～C₄アルコキシ若しくはハロゲンから選ばれる1以上の置換基を有していてもよいフェニル、チエニル、フリル、チアゾリル、フェノキシ、C₇～C₉フェニルアルキル、フェニルチオ、含窒素飽和環基、ピリジル若しくはイミダゾリルを表す。
- 15 Bは、-NH-D

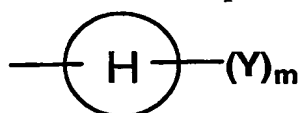
[Dは



(式中、R¹は水素又はC₁～C₄アルキルを表す。Xはハロゲン、C₁～C₄アルキル又はC₁～C₄アルコキシを表す。kは0～3の整数を表し、kが2以上の整数のとき、複数のXはそれぞれ異なってもよい。)



(式中、R² は水素又は C₁ ~ C₄ アルキルを表す。Y は C₁ ~ C₄ アルキル又は C₁ ~ C₄ アルコキシを表す。m は 0 ~ 6 の整数を表す。m が 2 以上のとき、複数の Y はそれぞれ異なっているとしてもよく、任意の 2 つの Y が連結して分岐しているてもよい C₁ ~ C₆ アルキレンを形成してもよい。)

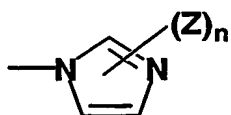


(式中、環 H は C₅ ~ C₇ シクロアルキルを表す。Y 及び m は前記と同義である。)



(式中、R³ は C₁ ~ C₅ アルキルを表す。R⁴ は C₅ ~ C₈ シクロアルキル又はチエニルを表す。)
又は C₃ ~ C₈ アルキルを表す。]

又は



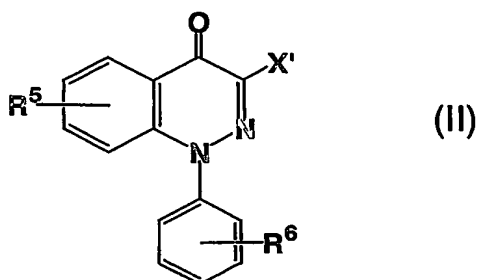
(式中、Z は C₁ ~ C₄ アルキル又はフェニルを表す。n は 0 ~ 2 の整数を表し、n が 2 のときこれらの Z は異なっているてもよい。)

を表し、

Q はベンゼン環、フラン環又は C₁ ~ C₄ アルキルで置換されていてもよいチオフェン環を表す。}

一般式 (I) で表される化合物は、例えば、特許第 2 7 3 0 4 2 1 号明細書に記載された方法に準じて製造することができる。

一般式 (II)

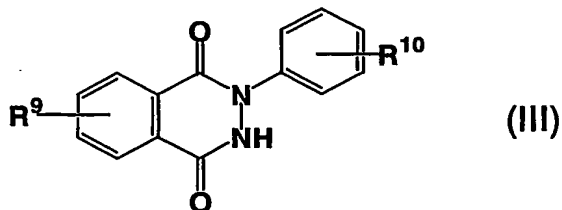


[式中、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル又はカルボキシルを表す。

X' は $-COOR^7$ (R^7 は水素又は置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキルを表す。)、 $-CONH_2$ 、 $-CN$ 、 $-COR^8$ (R^8 は置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキル又は置換されていてもよいアリールを表す。)、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 又は $-OR^7$ (R^7 は前記と同義である。)を表す。]

一般式 (II) で表される化合物は、例えば、J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1974, 752; Synthesis 1983, 52; 欧州特許公開第 1 9 7 2 2 6 号明細書; 米国特許第 4 7 2 9 7 8 2 号明細書; 国際公開第 9 3 / 0 9 0 9 8 号パンフレット等に記載された方法に準じて製造することができる。

一般式 (III)

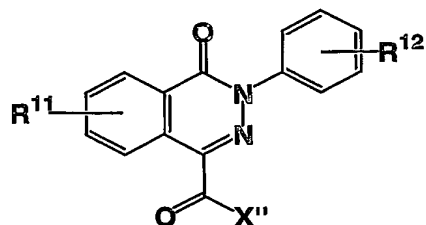


(式中、 R^9 、 R^{10} はそれぞれ独立して水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル又はカルボキシルを表す。)

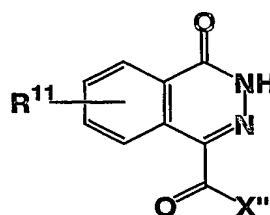
一般式 (III) で表される化合物は、例えば、Tetrahedron

Lett., 37, 1996, 24, 4145 等に記載された方法に準じて製造することができる。

一般式 (IV) 及び (V)



(IV)



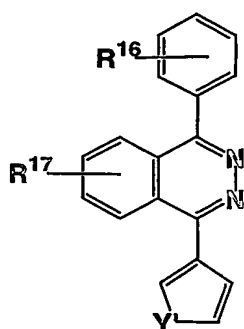
(V)

- 5 [式中、 R^{11} 及び R^{12} は、それぞれ独立して水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル又はカルボキシルを表す。 X'' は $-OR^{13}$ (R^{13} は水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル又はアリールを表す。)又は $-NR^{14}R^{15}$ (R^{14} 及び R^{15} は、
10 それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル又はアリールを表す。)]

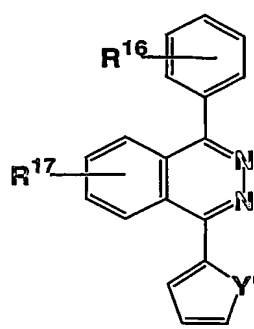
一般式 (IV) で表される化合物は、例えば、Heterocycles (1981), 16(1), 25-30 等に記載された方法に準じて製造することができる。

- 15 一般式 (V) で表される化合物は、Shenyang Yaoke Daxue Xuebao (2001), 18(2), 106-109; Chem. Pharm. Bull. (1980), 28(9), 2763-9; Heterocycles (1981), 16(1), 25-30 等の文献に記載された方法に準じて合成することができる。

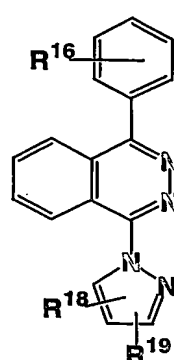
- 20 一般式 (VI), (VII), (VIII)



(VI)



(VII)



(VIII)

(式中、 R^{16} 及び R^{17} は、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル又はカルボキシルを表す。 R^{18} 及び R^{19} は、それぞれ独立して、水素又は $C_1 \sim C_6$ アルキルを表す。 Y' は酸素又は硫黄を表す。)

一般式 (VI) で表される化合物は、例えば、特開 2001-335476 号公報等に記載された方法に準じて製造することができる。

一般式 (VII) で表される化合物は、例えば、Tetrahedron Lett. (1986), 27(7), 869-872 等に記された方法に準じて製造することができる。

一般式 (VIII) で表される化合物は、例えば、Pharmazie, 46, 2, 1991, 105-8 等に記載された方法に準じて製造することができる。

これらのうち、一般式 (I)、(II) 又は (VIII) で表される二環式ピリダジン化合物、特にペリ位に置換基を有していてもよいフェニル基が結合し、かつその p 位に窒素原子又は酸素原子が結合した二環式ピリダジン化合物が好ましい。

一般式 (I) ~ (VIII) で表される化合物の薬理学上許容される塩としては、例えば、塩酸、硫酸、臭化水素酸、リン酸等の鉱酸塩；メタンスルホン酸、パラトルエンスルホン酸等のスルホン酸塩；酢酸、シュウ酸、クエン酸、リンゴ酸、

フマル酸塩等のカルボン酸塩などの酸付加塩：ナトリウム、カリウム、マグネシウム等の金属塩；アンモニウム塩；エタノールアミン、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール等の有機アミン塩などの塩基付加塩を用いることができる。

5 本発明に係るNAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用の抑制剤（以下「NAD(P)Hオキシダーゼ抑制剤」と記すことがある。）は、白血球のNADPHオキシダーゼ及び白血球以外の正常な状態のNAD(P)Hオキシダーゼには作用しないので、NAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用に起因する疾患、
10 例えば、虚血性心疾患、動脈硬化性疾患、脳卒中、糖尿病性合併症等の又は症状の軽減、特に免疫機能が低下している前記疾患の予防又は症状の軽減に極めて有効である。

 本発明に係るNAD(P)Hオキシダーゼ抑制剤を含む医薬組成物は、白血球のNADPHオキシダーゼ作用を実質的に
15 抑制せず、かつ白血球以外の組織のNAD(P)Hオキシダーゼ作用を抑制する化合物と慣用の製剤担体とを、適当な比率で混合した後、常法により処理することにより調製することができる。また、剤形は、投与方法に応じて、適宜、選択すればよく、例えば、経口投与用製剤としては、錠剤、顆粒剤、
20 細粒剤、散剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤及びエリキシル剤等が挙げられ、非経口用製剤としては、注射剤、貼付剤及び坐剤等が挙げられる。

 また、本発明に係る医薬組成物は、種々のリスクファクターにより惹起される疾患を予防し、又は症状を軽減するので、
25 脂質低下剤、降圧剤、血糖低下剤、血管拡張剤、抗血小板剤、抗凝固剤、脳保護薬、抗ガン剤、利尿剤、強心薬、鎮痛薬、抗浮腫薬、血栓溶解剤、免疫抑制剤、ステロイド、ビタミン剤又は抗酸化剤と、同時に若しくは別々に、又は逐次的に投与する形態で用いることができる。

本発明に係る医薬組成物中に含まれるNAD(P)Hオキシ
 ダーゼ抑制剤は、患者の年齢や状態などの条件に応じて、適
 宜、定めればよい。一般的には、成人に対して0.001～
 100mg/kg程度を非経口的に投与するか、0.001
 5 ～100mg/kg程度を経口的に投与する量を含むのが好
 ましい。

実施例

以下、実施例に基づき本発明を具体的に説明するが、本発
 10 明はその要旨を超えない限り以下の実施例に限定されるもの
 ではない。

以下の各試験に使用した化合物の構造式を以下に示す。な
 お、化合物A及び化合物Bは一般式(I)で表される化合物
 又はその塩、化合物C～化合物Gは一般式(II)で表される
 15 化合物、化合物Hは一般式(VIII)で表される化合物である。

| | 構造式 | | 構造式 |
|-------|-----|-------|-----|
| 化合物 A | | 化合物 B | |
| 化合物 C | | 化合物 D | |
| 化合物 E | | 化合物 F | |
| 化合物 G | | 化合物 H | |

試験例 1 NAD(P)Hオキシダーゼ抑制作用
(方法)

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial
Cells: Bio Whittaker 社。以下「H U V E C」と記す。) に
4 4 m M グルコースを添加し、8 日間培養した。次いで、界面活性剤 Triton-X Nonidet P-40 を含む Lysis buffer を添加し、NAD(P)Hオキシダーゼにより産生した cell lysate
中のインターロイキン-8 (以下「I L - 8」と記す。) を固
相酵素免疫検定法 (enzyme-linked immuno solvent assay)
で測定した。被験化合物はグルコース添加の 1 日前に添加した。

被験化合物を添加し 4 4 m M グルコース存在下で培養した細胞の I L - 8 産生を A、被験化合物を添加せず 4 4 m M グルコース存在下で培養した細胞の I L - 8 産生を B、被験化合物及び 4 4 m M グルコースをともに添加せずに培養した細胞の I L - 8 産生を C とし、以下の式により抑制率を算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - [(A - C) / (B - C)] \times 100$$

I C₅₀ 値は、得られた抑制率をもとに最小二乗法により求めた用量作用直線から算出した。結果を表 1 に示す。

表 1 I L - 8 産生抑制作用

| | 抑制率（％） | | | I C ₅₀ 値 （μ M） |
|-------|--------------|------|------|------------------------------|
| | 被験化合物濃度（μ M） | | | |
| | 0.01 | 0.1 | 1 | |
| 化合物 A | 39.5 | 59.8 | 74 | 0.0063 |
| 化合物 B | 63.8 | 77.8 | 72.0 | <0.01 |
| 化合物 C | -2.5 | 53.7 | 97.7 | 0.0154 |
| 化合物 D | 45.4 | 98.3 | 100 | 0.0111 |
| 化合物 E | 96.3 | ND | 91.0 | <0.01 |
| 化合物 F | 0 | 0 | 54.5 | 0.943 |
| 化合物 G | 39.7 | 43.9 | 57.4 | 0.219 |
| 化合物 H | 27.6 | 49.9 | 83.0 | 0.069 |

ND: データ無し

試験例 2 N A D (P) H オキシダーゼ抑制作用

- 5 Wistar 系雄性ラット (日本 S L C) の尾静脈から 0.05 M クエン酸バッファー (pH 4.5) に溶解したストレプトゾトシン 40 mg / kg を投与し、糖尿病ラットを作製した。ストレプトゾトシン静注 1 週間～8 週間後に、ヘパリン処理したキャピラリーを用いて尾静脈から採血し、直ちに氷冷後、
- 10 3000 rpm, 15 分, 4℃で遠心分離して血清を得た。グルコース測定用キット“GLUネオ シノテスト”(シノテスト社)により、マイクロプレートリーダー (SPECTRA MAX250, Molecular Devices 社) を用いて酵素法で血糖値を測定した。
- 15 糖尿病ラットに 3 日間被験化合物 (10mg/kg) を 1 日 1 回経口投与した。試験開始 4 日目に、大動脈のスーパーオキシドアニオン産生を指標とし、David. G. Harrison らの方法 (J.

Clin. Invest. 91, 2546-2551, 1993)を改良した以下の方法により、NAD(P)Hオキシダーゼ活性を測定した。

すなわち、上記処置を施していない正常ラット又は糖尿病ラットを腹部大動脈から放血させた後、胸部大動脈を摘出した。摘出した胸部大動脈を Krebs-Hepes buffer 中に浸し、周辺組織を除き、約 5 mm のリング標本を作製した。このリング標本を Krebs-Hepes buffer 中、37℃で10分間プレインキュベートした後、0.25 mM lucigenin (SIGMA 社)を含む Krebs-Hepes buffer 中に移した。500 μM の NADH を添加し、ルミノメーター (MULTI-BIOLUMAT LB9505C, ワラック・ベルトールド社)を用い、37℃で10分間化学発光数 (chemiluminescence: 単位 RLU: relative light units) を測定した。測定時間 (横軸) に対し化学発光数 (縦軸) をプロットした曲線の曲線下面積 (以下「AUC」という。) により、総化学発光数を算出した。測定した総化学発光数を、血管リング標本の湿重量で割付け、大動脈単位重量当たりのスーパーオキシドアニオン産生量に標準化した。

被験化合物を投与した糖尿病ラットの標準化した化学発光数を A、被験化合物を投与していない糖尿病ラットの標準化した化学発光数を B、被験化合物を投与していない正常ラットの標準化した化学発光数を C とし、下記式により抑制率 (%) を算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 - [(A - C) / (B - C)] \times 100$$

結果を表 2 及び表 3 に示す。

表 2 糖尿病ラットの大動脈 N A D (P) H オキシダーゼ活性

| | 化学発光 ($\times 10^5$ R L U / 大動脈湿重量) | 抑制率 (%) |
|-----------|---|------------|
| 正常ラット | 4.4 \pm 1.0 | — |
| 糖尿病ラット | 14.6 \pm 3.4 | — |
| 化合物 A 投与群 | 3.8 \pm 0.6 | 105.8 |

平均値 \pm 標準誤差

5 表 3 糖尿病ラット大動脈 N A D (P) H オキシダーゼ抑制作用

| 被験化合物 | 抑制率 (%) | | | |
|-------|-----------|----------|--------|---------|
| | 0.01mg/kg | 0.1mg/kg | 1mg/kg | 10mg/kg |
| 化合物 A | ND | ND | 76.9 | 105.8 |
| 化合物 B | ND | ND | ND | 88.5 |
| 化合物 C | 45 | 90 | ND | ND |
| 化合物 D | 44 | 72 | ND | ND |

ND: データ無し

表 1 ~ 3 に示したとおり、44 mM グルコース存在下で培養した内皮細胞及び糖尿病ラット大動脈の N A D (P) H オキシダーゼ活性は正常よりも高く、化合物 A ~ H はいずれも N A D (P) H オキシダーゼ阻害作用を示した。

試験例 3 正常ラット N A D (P) H オキシダーゼへの作用

正常 Wistar 系雄性ラット (日本 S L C) に 3 日間被験化合物 (10mg/kg) を投与し、試験例 2 と同様の方法で、大動脈のスーパーオキシドアニオン産生量を測定した。

被験化合物を投与したラットの標準化した化学発光数を A、被験化合物を投与していないラット (対照群) の標準化した

化学発光数を B とし、下式により抑制率（％）を算出した。

$$\text{抑制率（％）} = 100 - (A / B) \times 100$$

結果を表 4 に示す。

5 表 4 正常ラット大動脈 N A D (P) H オキシダーゼ抑制作用

| 被験化合物 | 化学発光 ($\times 10^5$ R L U / 大動脈湿重量) | 抑制率（％） |
|-------|---|---------|
| 対照群 | 3 . 9 6 \pm 2 . 9 | — |
| 化合物 A | 3 . 8 9 \pm 3 . 0 | 1 . 8 |
| 化合物 B | 4 . 0 1 \pm 6 . 0 | — 1 . 3 |

平均値 \pm 標準誤差

化合物 A 及び B は、いずれも正常ラットのスーパーオキシドアニオン産生に影響を与えなかった。

10 試験例 4 大動脈 N A D (P) H オキシダーゼ阻害作用

試験例 2 と同様の方法で摘出した腹部大動脈を Krebs-Hepes buffer 中に浸し、周辺組織を除き、約 5 m m のリング標本を作成した。このリング標本を、被験化合物（化合物 A、化合物 B 又は D P I （S I G M A 社））を添加した
 15 Krebs-Hepes buffer 中、37℃、10 分間ブレインキュベートした後、リング標本を 0 . 2 5 m M lucigenin を含む Krebs-Hepes buffer 中に移した。500 μ M の N A D H と被験化合物を添加し、化学発光数を 37℃ で 10 分間測定した。

測定時間（横軸）に対し、化学発光数（縦軸）をプロット
 20 した曲線の A U C により、総化学発光数を算出した。得られた化学発光数値を、血管リング標本の湿重量で割付け、大動脈単位重量当たりのスーパーオキシドアニオン産生量に標準化した。

被験化合物を添加したリング標本の標準化した化学発光数

を A、被験化合物を添加しなかったリング標本（対照）の標準化した化学発光数を B とし、下式により阻害率（％）を算出した。

$$\text{阻害率（％）} = 100 - (A / B) \times 100$$

5 結果を表 5 に記す。

表 5 糖尿病ラット大動脈 N A D (P) H オキシダーゼ阻害作用

| 被験化合物 | 化学発光 ($\times 10^5$ R L U / 大動脈湿重量) | 阻害率（％） |
|------------------------|---|--------|
| 対 照 | 9.3 \pm 0.5 | — |
| 化合物 A (0.1 μ M) | 9.1 \pm 1.7 | 2.2 |
| 化合物 A (1 μ M) | 9.2 \pm 1.7 | 1.1 |
| D P I (200 μ M) | 5.2 \pm 1.1 | 45.1 |

平均値 \pm 標準誤差

10 化合物 A は N A D (P) H オキシダーゼ阻害作用を示さなかったが、非特異的 inhibitor である D P I は N A D (P) H オキシダーゼ阻害作用を示した。

試験例 5 白血球 N A D P H オキシダーゼに対する作用

15 正常 Wister 雄性ラット（日本 SLC）の腹部大動脈から採血し、直ちに血液 3 m L に対し 4 2 m L の氷冷 Lysis buffer と混和した。5 分後、4℃、1 1 0 0 r p m で 5 分間遠心分離した。沈渣を氷冷 Lysis buffer に懸濁し、再び 4℃、1 1 0 0 r p m で 5 分間遠心分離した。この操作を 3 回繰り返す

ことにより、白血球を得た。得られた白血球を Krebs-Hepes buffer で懸濁して細胞数を 1×10^6 個 / ml に調整した。

0.25 mM lucigenin 及び被験薬を添加し、さらに Phorbol 12-myristate 13-acetate (以下「PMA」と記す。

5 SIGMA社。)を添加した後、化学発光数を 37°C で10分間測定した。

被験化合物を添加した白血球懸濁液の総化学発光数をA、被験化合物を添加しなかった白血球懸濁液(対照)の総化学発光数をBとしPMAで刺激しなかった白血球懸濁液の総化学発光数をCとし、下式により抑制率(%)を算出した。

抑制率(%) = $100 - [(A - C) / (B - C)] \times 100$

結果を下記表6に示した。

表6 白血球NADPHオキシダーゼに対する作用

| | | 抑制率 (%) | |
|------|----------------|---------|------------|
| 化合物A | 1 μ M | 2.4 | \pm 13.6 |
| 化合物B | 1 μ M | 11.7 | \pm 24.2 |
| DPI | 200 μ g/mL | 106.7 | \pm 0.2 |

15 平均値 \pm 標準誤差

化合物A、Bは、白血球のNADPHオキシダーゼに対する抑制作用を示さなかったが、非特異的 inhibitor であるDPIは白血球のNADPHオキシダーゼに対する抑制作用を示した。

20 試験例1～5の結果から、一般式(I)～(VIII)で表される二環式ピリダジン化合物は、白血球のNADPHオキシダーゼには抑制作用を示さず、白血球以外の組織におけるNAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用に対する抑制作用を有することが明らかとなった。

試験例 6 酸化低密度リポタンパク質 (low-density lipoprotein、以下「LDL」と記す。) による NAD(P)H オキシダーゼ発現抑制に対する作用

HUVEC を 24 穴コラーゲンコートプレートに播種した。
5 化合物 A を添加し、24 時間後に健常人ボランティア血液より調製した酸化 LDL を $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した。

酸化 LDL 添加 24 時間後に、MgExtractor (TOYOBO) を用いて totalRNA を抽出し、DNase I 処理 (日本 gene) を行った。

10 この一部を分取し、吸光度 (OD_{260}) を測定することにより、totalRNA の濃度を算出した。

得られた totalRNA 100 ng を用いて RT (reverse transcription) 反応 (ABI 社) を行い、cDNA を合成した。

15 合成した cDNA $10 \mu\text{L}$ を用いて PCR (polymerase chain reaction) を行い (ABI 社)、NAD(P)H オキシダーゼ主要構成成分である $p22^{\text{phox}}$ 、内在コントロールとして $\beta\text{-actin}$ の発現量を測定した。

20 $p22^{\text{phox}}$ の発現量を $\beta\text{-actin}$ の発現量で標準化し、正常の $(p22^{\text{phox}}) / (\beta\text{-actin})$ の発現量を 100% として表した。

表 7 $p22^{\text{phox}}$ 発現に対する作用

| 正常群 | 酸化 LDL 添加群 (対照群) | 酸化 LDL + 化合物 A ($0.1 \mu\text{M}$) 添加群 |
|---------------------|---------------------|---|
| $100.00 \pm 2.01\#$ | 165 ± 8.05 | $116.64 \pm 16.61*$ |

: $p < 0.05$ (対照群に対する t 検定)

25 * : $p < 0.05$ (対照群に対する t 検定)

平均値 \pm 標準誤差

酸化LDL添加によりHUVECのp22^{phox}発現が、
約1.6倍上昇した。一方、化合物A添加群のp22^{phox}
発現は、正常群の1.2倍にすぎず、化合物Aが酸化LDL
5 添加によるp22^{phox}発現上昇を抑制したことがわかる。

試験例7 動脈硬化阻害作用

雄性NZWウサギ（日本SLC）に、12週間0.67%
コレステロール含有飼料を40g/kg/day及び化合物
10 Aを与えた。耳介静脈からヘパリン処理したキャピラリーを
用いて採血し、3000rpmで10分間遠心して得られた
血漿中のトータルコレステロール（以下「TC」と記す。）値
を、測定キットを用い酵素法で測定した。

結果を表9に示す。

12週間後、ペントバルビタール麻酔下で頸動脈を剥離・
摘出した後、脱血し、大動脈を摘出した。得られた頸動脈を、
直ちにKrebs緩衝液に浸し、慎重に周囲の組織を除去し、内
皮細胞に損傷を与えないようにして、リング標本を作成した。
20 次いで、リング標本を95%O₂ - 5%CO₂混合ガスの通
気下で、37℃のKrebs緩衝液を満たしたマグナス槽中に懸
垂し、2gの張力負荷により定常状態となった後、実験を行
った。

弛緩反応を測定する際には、ノルエピネフリンであらかじめ
25 標本を収縮させておき、収縮が一定になった時点でアセチ
ルコリンを累積的に添加した。10μMのノルエピネフリン
により引き起こされた収縮を100%として血管の弛緩率を
求めた。

トランスジューサー（日本光電）を用いて、等尺性に張力

を測定した。対照群に対する二元配置分散分析 (Dunnett 法) により有意差検定を行った。

摘出した大動脈を弓部・胸部・腹部大動脈に分割し、10%ホルマリン緩衝液で固定後、写真撮影を行い、大動脈に沈着した脂質面積を測定し、大動脈面積に対する脂質沈着部の面積の割合を求めた。

結果を表 8 に示す。

表 8 ウサギ動脈硬化モデルにおける脂質沈着に対する効果

| | 脂質沈着面積 (%) | |
|-----------------|----------------|---------------|
| | 胸部大動脈 | 腹部大動脈 |
| 正常食群 | 0.2 ± 0.1## | 2.1 ± 0.7## |
| 対照群 | 93.5 ± 4.0 | 67.6 ± 8.6 |
| 化合物 A (1mg/kg) | 62.1 ± 10.0 ** | 25.4 ± 6.2 ** |
| 化合物 A (10mg/kg) | 56.5 ± 10.5 ** | 18.2 ± 2.2 ** |

: $p < 0.01$ (対照群に対する Dunnett 法)

** : $p < 0.01$ (対照群に対する t 検定)

平均値 ± 標準誤差

表 9 コレステロール負荷 12 週後の血中脂質に対する作用

| | 血漿中脂質濃度 TC (mg/dL) |
|-----------------|--------------------|
| 正常食群 | 34.1 ± 3.3## |
| 対照群 | 2212.8 ± 284.1 |
| 化合物 A (1mg/kg) | 1895.3 ± 244.6 |
| 化合物 A (10mg/kg) | 1887.9 ± 103.9 |

: $p < 0.01$ (対照群に対する t 検定)

平均値 ± 標準誤差

0.67% コレステロール含有飼料投与で対照群の血漿中のTC値は約2000 mg/dLに上昇した。血漿中のTC値は対照群と比較して有意な低下作用を示さなかった。

5 頸動脈の内皮依存性血管弛緩反応について、アセチルコリン（以下「A c h」と記す。） $10^{-8} \sim 10^{-5}$ Mの濃度反応曲線を図1に示した。

対照群のA c hによる弛緩反応は、正常食群に対して有意に減弱した。一方、化合物A投与群のA c hによる弛緩反応は、対象群と比較して、有意に改善された。

15 化合物Aは動脈硬化のリスクファクターである高脂血症の改善作用なしに、胸部、腹部大動脈への脂質沈着を有意に阻害した。この結果は、血漿中に高濃度の脂質が存在している状態においても、化合物Aが組織への脂質沈着を阻害し、血管内皮依存性弛緩反応を改善することを示している。

試験例8 ラット左冠動脈結紮心筋梗塞モデルに対する作用

SD系雄性ラット（日本S L C）をエーテル麻酔下で背位固定し、Selye H.らの方法（Angiology, 1960, 11, 398）に従い、
20 胸骨左線に沿って縦切開を加え開胸し、心臓を露出させた。左冠動脈を起始部から1-2 mmの部位を4号シルク糸により結紮し、心臓を元に戻し、すばやく脱気した後、閉胸した。心電計（日本光電）により心筋梗塞の状態であることを確認した。
25 結紮24時間後に腹部大動脈から放血致死させ心臓を取り出し、中央部の横断輪状切片を、0.1 Mリン酸緩衝液に溶解した1%塩化2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウム（以下「T T C」と記す。）溶液中、遮光下で20分インキュベートした。その後、切片をホルマリン緩衝液で固定し、

23

切片をトレースし、梗塞部（TTC非染色部）面積、左心室面積を算出した。冠動脈結紮直後、化合物Aを1%CMC溶液に懸濁し、経口投与した。

抑制率は次式で算出した。

$$5 \quad \text{抑制率}(\%) = 100 - \frac{\text{化合物投与群の梗塞率}}{\text{化合物非投与群の梗塞率}} \times 100$$

$$\text{梗塞率}(\%) = (\text{梗塞部面積} / \text{左心室面積}) \times 100$$

10 また、化合物A（1mg/kg）を結紮15分、1時間、3時間後に経口投与し、梗塞抑制作用を検討した。結果を下表に示す。

表10 ラット急性心筋梗塞モデルに対する作用

| | 梗塞率 (%) | 抑制率 (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 非投与 | 40 | — |
| 化合物A (0.1mg/kg) | 40 | 0 |
| 化合物A (0.3mg/kg) | 17.2 ** | 57 ** |
| 化合物A (1mg/kg) | 6.3 ** | 84.3 ** |

** : p<0.01 (化合物非投与群に対する Dunnett 法)

15 表11 結紮後投与時の梗塞率に対する作用

| | 梗塞率 (%) | 抑制率 (%) |
|------|---------|---------|
| 非投与 | 40 | — |
| 15分後 | 10.5 ** | 73.8 |
| 1時間後 | 16.7 ** | 58.3 |
| 3時間後 | 29.3 * | 26.8 |

* : p<0.05, ** : p<0.01 (化合物非投与群に対する Dunnett 法)

化合物非投与群において、左心室に対する梗塞率は約 40 %であったのに対し、化合物 A 投与群は、0.3 mg / kg、1 mg / kg 投与群で有意な梗塞率の抑制作用があった。

5 試験例 9 ウサギ虚血再灌流心筋梗塞モデルに対する作用

10 雄性 N Z W ウサギ（日本 S L C）を背位固定後、ペントバルビタール麻酔し開胸した後、左冠動脈基始部に 4 号シルク糸をかけ、さらに長さ 1 cm のポリエチレンチューブをあてて糸で左冠動脈を結紮した。結紮 2 時間後にポリエチレンチューブ上の糸を切断し、血流を再開させた。再灌流 4 時間後に、4 号シルク糸で冠動脈基始部を結紮し、3 % エバンスブルー液を 1 mL / kg 静脈内投与した。5 分後に過剰量のペントバルビタールを投与し心臓及び大動脈を摘出した。心臓を幅 3 mm の輪状に切断し、左心室面積、虚血領域（エバンスブルー非染色部）をトレースした。

15 さらに 1 % T T C 溶液中で 30 分インキュベートした後、梗塞巣（T T C 非染色部）をトレースした。化合物 A（1 mg / kg）は結紮 1 時間前に投与した。

左心室面積に対する虚血域、梗塞巣の割合を算出した。

20 心臓の一部を液体窒素で凍結し、クラッシャーにより粉碎、リン酸緩衝液でホモジネートした。この懸濁液を 3000 rpm で 10 分、さらに上清 8 mL を 15000 rpm で 15 分遠心分離し、得られた上清を o-dianisidine dihydrochloride を含むリン酸緩衝液と混合し、25℃、30 分静置した後、吸光度（OD₄₆₀）を測定し、ミエロパーオキシダーゼ（M P O）活性を求めた。M P O 活性は正常群の値を 100 % として表した。結果を表 12 に示す。

25

表 1 2 ウサギ心筋梗塞モデルに対する作用

| | 梗塞面積／虚血面積 | 心筋内 M P O 活性 |
|-----------|-----------|--------------|
| 正常群 | — | 1 0 0 % |
| 対照群 | 5 8 % | 2 4 8 % ## |
| 化合物 A 投与群 | 1 4 % * | 1 2 8 % * |

* : $p < 0.05$ (対照群に対する t 検定)## : $p < 0.01$ (正常群に対する t 検定)

- 5 対照群では、虚血域に対する梗塞巣の割合は 5 8 % であった。それに対し化合物 A 投与群では、この割合は 1 4 % となり、有意な抑制作用が認められた。また、心筋内への白血球浸潤の指標となる M P O 活性は、対照群（梗塞心臓）で正常群に対して有意に増加したが、化合物 A 投与群では対照群に
- 10 対して有意に抑制された。

試験例 1 0 ウサギ慢性心筋梗塞（心不全）モデルに対する作用

- 15 雄性 N Z W ウサギ（日本 S L C）を背位固定後、ペントバルビタール麻酔し開胸した後、左冠動脈基始部に 4 号シルク糸をかけ、さらに長さ 1 c m のポリエチレンチューブをあてて糸で左冠動脈を結紮した。結紮 2 時間後にポリエチレンチューブ上の糸を切断し、血流を再開させた。再開通 2 時間後に化合物 A（1 m g / k g）を 1 回投与し、その後、1 日 1
- 20 回 1 2 週間にわたり投与した。1 2 週間後に過剰量のペントバルビタールを投与した後、心臓を摘出し、その重量及び左心室中央の壁の厚さを測定した。結果を以下に示す。

致死率と心重量、左心室厚により化合物を評価した。

| | 結紮 2 週間 | 結紮 4 週間 | 死亡率 |
|-----------|---------|---------|-------|
| 非投与群 | 3 / 2 0 | 6 / 2 0 | 3 0 % |
| 化合物 A 投与群 | 0 / 1 2 | 1 / 1 2 | 8 % |

表 1 4 心重量に対する作用

| | 心重量 (g/kg body weight) | 左心室厚 (mm) |
|-----------|------------------------|-----------|
| 正常群 | 1.85# | 1.23# |
| 非投与群 | 2.35 | 1.01 |
| 化合物 A 投与群 | 2.05* | 1.17* |

* : $p < 0.05$ (対照群に対する t 検定)# : $p < 0.05$ (対照群に対する t 検定)

5

ウサギ虚血再灌流心筋梗塞後、12週間で被験化合物非投与群は、心重量の増加及び左心室厚の薄弱化が認められ、心筋梗塞後の心不全への移行時にみられる心臓の膨化・腫大を示した。化合物 A 投与群では、心重量の増加及び左心室厚の薄弱化が抑制された。

10

試験例 1 1 脳梗塞モデルに対する作用 (虚血性脳障害モデル)

ICR系雄性マウス (日本 S L C) をエーテル麻酔し、背位に固定し、両総頸動脈を糸で結紮した。すばやく傷をふさぎ、直ちにマウスをケージ内に解放、30分毎に240分までの死亡の有無を確認し、各群の累積死亡率を求めた。総頸動脈結紮1時間前に化合物 B を経口投与した。

15

20

表 1 5 累積死亡率に対する作用

| 死亡数 | 対照群 | 化合物 B (1 mg/kg) | 化合物 B (3 mg/kg) | 化合物 B (10 mg/kg) |
|----------|------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| 0～ 30 | 22 (71.0%) | 15 (78.9%) | 11 (57.9%) | 8 (40.0%) |
| 31～ 60 | 5 (87.1%) | 2 (84.2%) | 5 (84.2%) | 6 (70.0%) |
| 61～ 90 | 0 | 2 (94.7%) | 0 | 2 (80.0%) |
| 91～ 120 | 2 (93.5%) | 0 | 0 | 1 (85.0%) |
| 121～ 150 | 0 | 0 | 1 (89.5%) | 0 |
| 151～ 180 | 2 (100%) | 0 | 0 | 0 |
| 181～ 210 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 211～ 240 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合計 | 31 | 20 | 19 | 19 |

化合物 B 投与群では、両頸動脈結紮による脳虚血モデルに対して、死亡率の改善効果がみられた。

5

産業上の利用可能性

本発明に係る N A D (P) H オキシダーゼを含む医薬組成物は、種々のリスクファクターにより起こる疾患の予防や症状の軽減に用いることができ、しかも免疫機能に与える影響が

10

なお、本出願は、日本特許出願 特願 2 0 0 3 - 1 0 3 5 7 6 号を優先権主張して出願されたものである。

請求の範囲

1. 白血球のNADPHオキシダーゼ作用を実質的に阻害せず、かつ白血球以外の組織のNAD(P)Hオキシダーゼ作用を抑制する化合物を含有するNAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用の抑制剤。

2. 白血球以外の組織が、血管細胞系、心臓、腎臓、網膜、ミクログリア又は腫瘍細胞の組織であることを特徴とする請求項1記載の抑制剤。

3. NAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用が、糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満、喫煙、心不全、心肥大、虚血性心疾患、又は血管再開通療法若しくは臓器移植術の虚血再灌流により生じたものであることを特徴とする請求項1又は2記載の抑制剤。

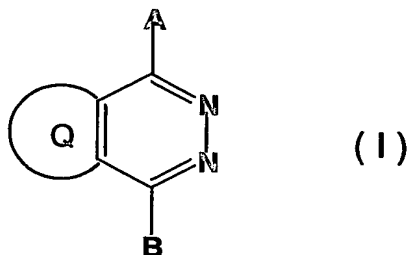
4. NAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用が、ガン又は痴呆症により生じたものであることを特徴とする請求項1又は2記載の抑制剤。

5. NAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用が、化学物質の摂取により生じたものであることを特徴とする請求項1又は2記載の抑制剤。

6. 白血球のNADPHオキシダーゼには実質的に作用せず、かつ白血球以外の組織のNAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用を抑制する化合物が、下記一般式(I)から(VIII)で表される二環式ピリダジン化合物又はその薬理学上許容される

塩であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の抑制剤。

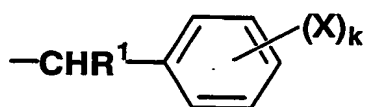
一般式 (I)



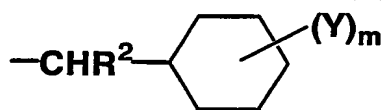
- 5 〔式中、A は $C_3 \sim C_6$ アルキル、 $C_5 \sim C_7$ シクロアルキル又はそれぞれが $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ若しくはハロゲンから選ばれる 1 以上の置換基を有していてもよいフェニル、チエニル、フリル、チアゾリル、フェノキシ、 $C_7 \sim C_9$ フェニルアルキル、フェニルチオ、含窒素飽和環基、ピリジル若しくはイミダゾリルを表す。
- 10

B は、 $-NH-D$

〔D は

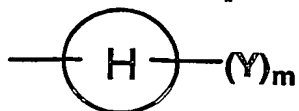


- (式中、 R^1 は水素又は $C_1 \sim C_4$ アルキルを表す。X はハロゲン、 $C_1 \sim C_4$ アルキル又は $C_1 \sim C_4$ アルコキシを表す。k は 0 ～ 3 の整数を表し、k が 2 以上の整数のとき、複数の X はそれぞれ異なってもよい。)
- 15



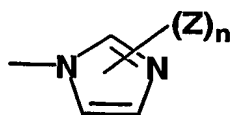
- (式中、 R^2 は水素又は $C_1 \sim C_4$ アルキルを表す。Y は $C_1 \sim C_4$ アルキル又は $C_1 \sim C_4$ アルコキシを表す。m は 0 ～ 6 の整数を表す。m が 2 以上のとき、複数の Y はそれぞれ異なってもよく、任意の 2 つの Y が連結して分岐してい
- 20

てもよい $C_1 \sim C_6$ アルキレンを形成してもよい。)



(式中、環Hは $C_5 \sim C_7$ シクロアルキルを表す。Y及びmは前記と同義である。)

- 5 $-CHR^3R^4$ (式中、 R^3 は $C_1 \sim C_5$ アルキルを表す。
 R^4 は $C_5 \sim C_8$ シクロアルキル又はチエニルを表す。)
 又は $C_3 \sim C_8$ アルキルを表す。]
 又は

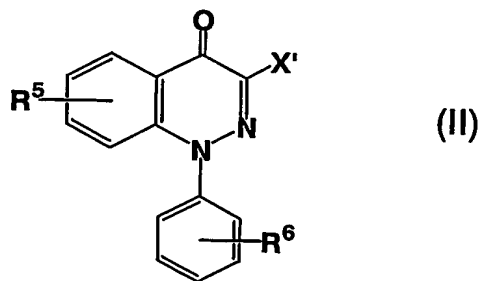


- 10 (式中、Zは $C_1 \sim C_4$ アルキル又はフェニルを表す。nは
 0 ~ 2 の整数を表し、nが2のときこれらのZは異なってい
 てもよい。)

を表し、

Qはベンゼン環、フラン環又は $C_1 \sim C_4$ アルキルで置換さ
 れていてもよいチオフェン環を表す。}

- 15 一般式 (II)

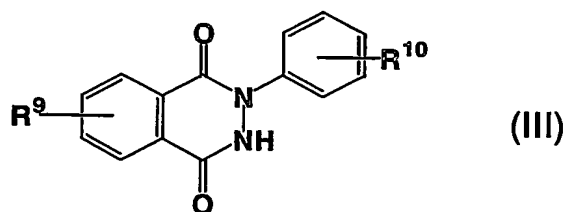


[式中、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して水素、 $C_1 \sim C_6$
 C_6 アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニ
 トロ、アミノ、トリフルオロメチル又はカルボキシルを表す。
 X' は $-COOR^7$ (R^7 は水素又は置換されていてもよい

$C_1 \sim C_6$ アルキルを表す。)、 $-CONH_2$ 、 $-CN$ 、 $-COR^8$ (R^8 は置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキル又は置換されていてもよいアリールを表す。)、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 又は $-OR^7$ (R^7 は前記と同義である。)を表す。]

5

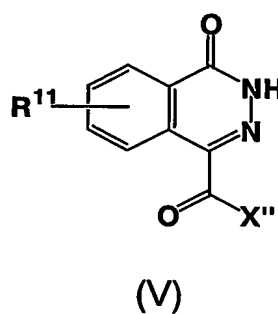
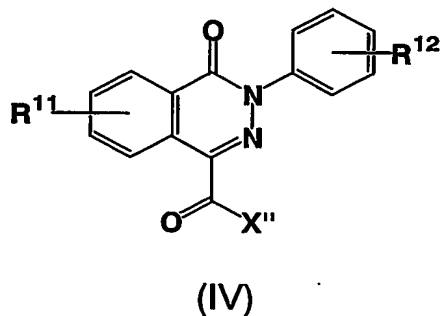
一般式 (III)



(式中、 R^9 、 R^{10} はそれぞれ独立して水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル又はカルボキシルを表す。)、

10

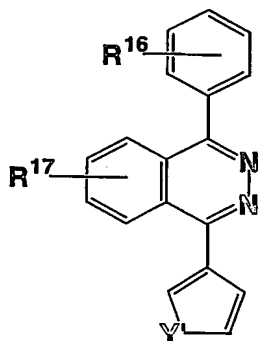
一般式 (IV) 及び (V)



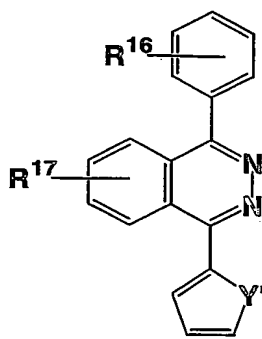
[式中、 R^{11} 及び R^{12} は、それぞれ独立して水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル又はカルボキシルを表す。 X'' は $-OR^{13}$ (R^{13} は水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル又はアリールを表す。)又は $-NR^{14}R^{15}$ (R^{14} 及び R^{15} は、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル又はアリールを表す。)]

15

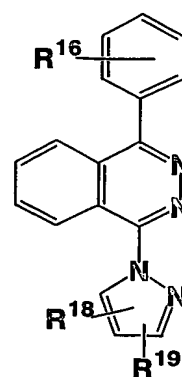
一般式 (VI), (VII), (VIII)



(VI)



(VII)



(VIII)

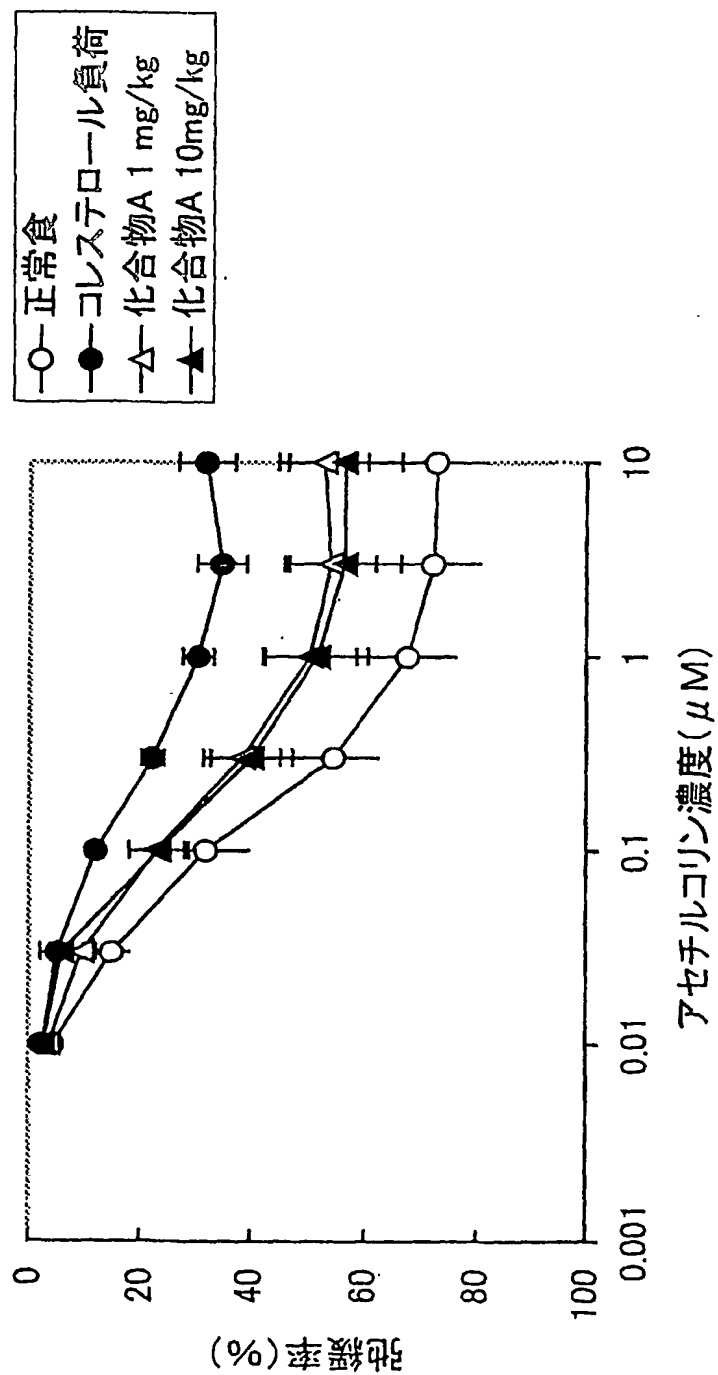
(式中、 R^{16} 及び R^{17} は、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アルコキシ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アミノ、トリフルオロメチル又はカルボキシルを表す。 R^{18} 及び R^{19} は、それぞれ独立して、水素又は $C_1 \sim C_6$ アルキルを表す。 Y' は酸素又は硫黄を表す。)

7. 請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の抑制剤を有効成分とする NAD(P)H オキシダーゼの過剰作用に起因する疾病用の医薬組成物。

8. 脂質低下剤、降圧剤、血糖低下剤、血管拡張剤、抗血小板剤、抗凝固剤、脳保護薬、抗ガン剤、利尿剤、強心薬、鎮痛薬、抗浮腫薬、血栓溶解剤、免疫抑制剤、ステロイド剤、ビタミン剤又は抗酸化剤と、同時に若しくは別々に、又は逐次的に投与する形態であることを特徴とする請求項 7 記載の医薬組成物。

1 / 1

第1図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/502, A61P3/10, 3/04, 3/06, 9/00, 9/10, 9/04,
43/00//C07D403/04, 237/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/502, A61P3/10, 3/04, 3/06, 9/00, 9/10, 9/04,
43/00, C07D403/04, 237/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | JP 10-109936 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 28 April, 1998 (28.04.98), Full text; particularly, Claims; examples (Family: none) | 1-8 |
| X | JP 8-034734 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 06 February, 1996 (06.02.96), Full text; particularly, Claims; examples & EP 682947 A1 & US 5643911 A & CN 1116526 A & CA 2149691 A | 1-8 |
| X | JP 6-135938 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 17 May, 1994 (17.05.94), Full text; particularly, Claims; examples & EP 534443 A1 & US 5324727 A & CA 2078699 A | 1-8 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 July, 2004 (13.07.04)

Date of mailing of the international search report
17 August, 2004 (17.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005065

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | JP 4-211666 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 03 August, 1992 (03.08.92), Full text; particularly, Claims; examples & EP 449203 A1 & US 5089494 A & CA 2039258 A | 1-8 |
| X | JP 2-129180 A (Morishita Pharmaceutical Co., Ltd.), 17 May, 1990 (17.05.90), Full text; particularly, Claims; examples (Family: none) | 1-8 |
| A | JP 62-228067 A (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 October, 1987 (06.10.87), Full text; particularly, Claims; examples (Family: none) | 1-8 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005065

<Subject of search>

Claims 1 to 8 relate to an NAD(P)H oxidase hyperfunction inhibitor containing, as the active ingredient, a compound defined by a desired property "substantially not inhibiting NADPH oxidase originating in leukocytes but inhibiting NAD(P)H oxidase originating in tissues other than leukocytes" or a medicinal composition for diseases caused by the hyperfunction of NAD(P)H oxidase. It is recognized that only specific small part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is considered, the scope of compounds having the above property cannot be specified.

Such being the case, the search was made mainly on the compounds A to H which is specifically illustrated as having the above property in the description (in the description, the compounds A and B alone are specifically shown as not inhibiting the leukocyte NADPH oxidase function).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 31/502, A61P3/10, 3/04, 3/06, 9/00, 9/10, 9/04, 43/00 // C07D403/04, 237/26

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 31/502, A61P3/10, 3/04, 3/06, 9/00, 9/10, 9/04, 43/00, C07D403/04, 237/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | JP 10-109936 A (三菱化学株式会社) 1998.04.28 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 (ファミリーなし) | 1-8 |
| X | JP 8-034734 A (三菱化学株式会社) 1996.02.06 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 &EP 682947 A1 &US 5643911 A &CN 1116526 A &CA 2149691 A | 1-8 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.07.2004

国際調査報告の発送日

17.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳予子

4P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | JP 6-135938 A (三菱化成株式会社) 1994. 05. 17 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 &EP 534443 A1 &US 5324727 A &CA 2078699 A | 1-8 |
| X | JP 4-211666 A (三菱化成株式会社) 1992. 08. 03 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 &EP 449203 A1 &US 5089494 A &CA 2039258 A | 1-8 |
| X | JP 2-129180 A (森下製薬株式会社) 1990. 05. 17 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 (ファミリーなし) | 1-8 |
| A | JP 62-228067 A (大日本製薬株式会社) 1987. 10. 06 全文、特に特許請求の範囲及び実施例参照 (ファミリーなし) | 1-8 |

<調査の対象について>

請求の範囲1～8は、「白血球のNADPHオキシダーゼ作用を実質的に阻害せず、かつ白血球以外の組織のNAD(P)Hオキシダーゼ作用を抑制する」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とするNAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用の抑制剤、又はNAD(P)Hオキシダーゼの過剰作用に起因する疾患用の医薬組成物に関するものである。そして、上記性質を有する化合物のうち、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、特定のわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、出願時の技術常識を勘案しても、上記性質を有する化合物の範囲を特定することができない。

よって、調査は、上記性質を有することが明細書に具体的に記載されている化合物A～Hを中心に行った（なお、明細書において、白血球のNADPHオキシダーゼ作用を実質的に阻害しないことまで具体的に示されているのは、化合物A及びBにとどまる）。